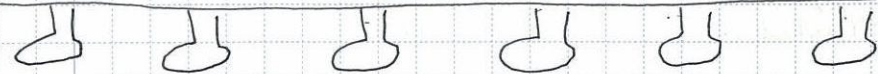


今日思、たこと

凍っている試薬で使うときは完全に解かしてから使、た方がいいかもです。
一部凍、た状態では、凍、っているところと解、けているところとで濃度が異なるからです。



8/29

鈴木 10:130~
孫 11:00~
山崎 10:30~

たこと

① PI 7L (RBS + lacI) を

5': F-Xh-lacI+tag 5'
3': F-N-lacI+tag 3'

***重要(時計班要確認)**

~~tagの位置も間違えやすいので注意!~~

2. PCR (Pfu) 使用

[lacI] は 1000 bp (3.8 kb) の 7.5 kb

95°C 2min

95°C 30 sec

55°C 30 sec

72.5°C 20 sec

95°C sec 13 29回 47回

25°C 00

この後、試薬の量を確認し、2. PCR 実行。

② PI 23L (double terminator) のシーケンスシーク準備

プライマーは

5': PI-23L-seq 5' 使用。
3': PI-23L-seq 3'

プライマー希釈液 (3.5 µg/mL)

0.1 mL

[0.90815 PI-23L B.X. 処理した]

5' プライマー

0.5 mL

3' プライマー

0.5 mL

リブライジング溶液

8.5 mL

→ BIGDYE プログラムで PCR:

1. 96°C 2min
2. 96°C 10 sec
3. 55°C 5 sec
4. 60°C 3 min
5. Goto 2. 29 times.
6. 25°C forever.

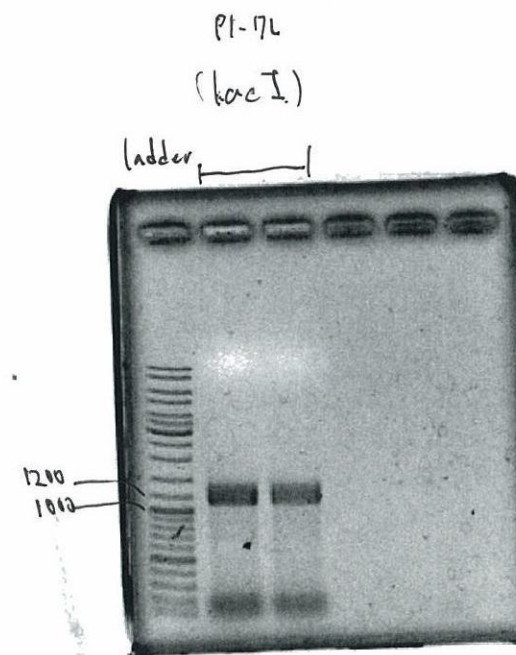
PI-23L:

1 2

5' 3'

これは全部 Hi-Di

Aug Sat 29 16:07:56 2009 LAS-4000#7662211 FUJINON VRF43LMD Cooling:-25 C
Full Precision High Resolution 10sec EtBr Fluoro B Tray Position 3
Range:1024-5119 Gradation:1792-2335 Linear LAS-4000IR ver2.0W



PI-7L の PCR 産物を電気泳動した結果。

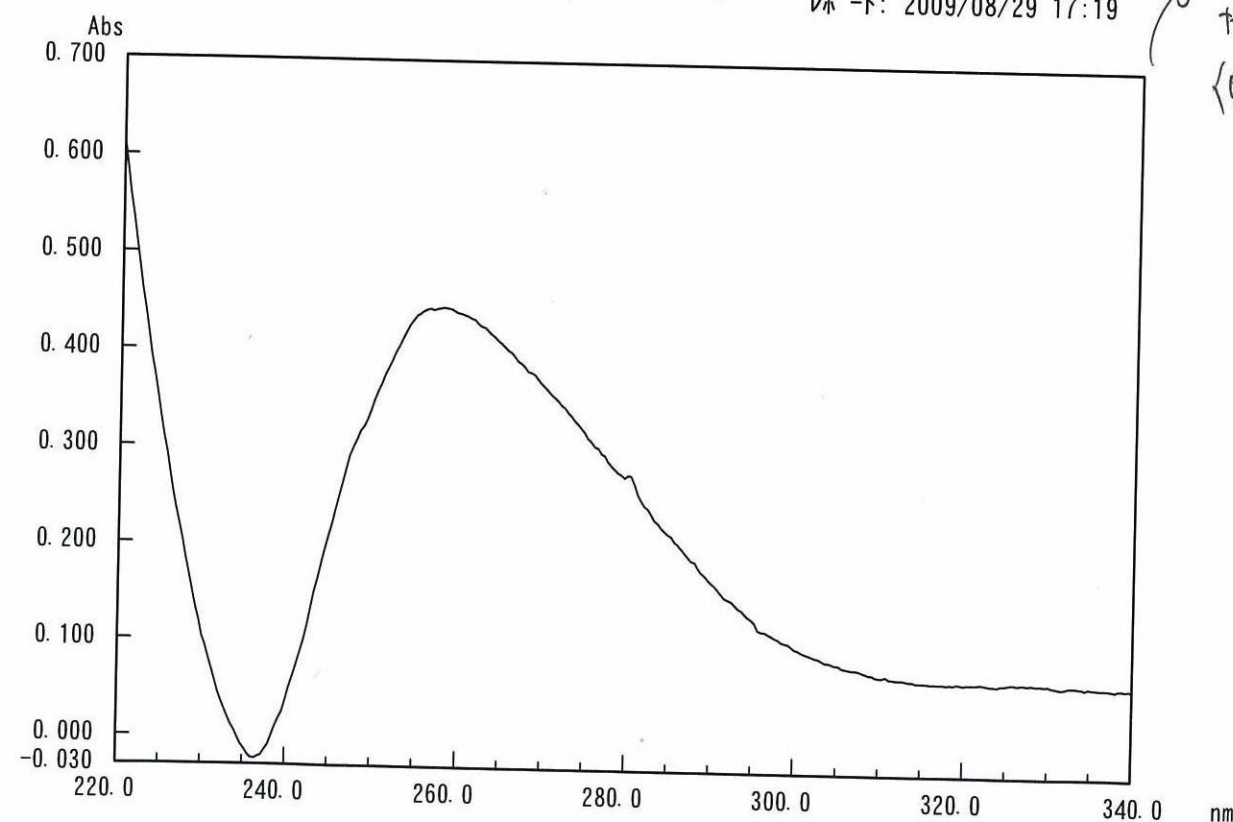
LacI のサイズ 1000 ~ 800

近辺に当たったこと。

この 1200 bp 前後のバンドで切り出し、その結果が。

PI-7L (lacI + RBS) の 47L 切り出し後、精製したもの

日時: 2009/08/29 17:19



計算結果

230.0 (nm)	260.0 (nm)	280.0 (nm)	320.0 (nm)	Ratio	Conc (ug/mL)	Pure (%)	P. Conc (mg/mL)	M. Conc (uM)
0.102	0.440	0.276	0.066	1.781	18.70	98.9	0.041	0.854

③ 8/28の③のシーケンス。 (他のもの詳細は8/28のノートに載っている)

○ 結果

① Ygat は、3'のみ読めた (①が1000超, ②が360くらい)

LDLR と Ygat 5' は NNNNNN。

→ 読めた部分も精度は悪い (①のみ)。②は精度良好。

④ 8/28のシーケンスの解析

○ CI: 両端が読めた、結果は全一致 (2-1) である。

・ lacI: 5'側のものが670bpくらいある。5'側のものはX。

・ Ygat: 5'側のものが100%ある。

・ LDLR: 不可。

8/30-1222

① Pl 23Lのシーケンス (時計の針の中)。

② LDLRのシーケンス

※今回は DMSO を加えてやってみたい。

プライマーは F-β-Gp-LDLR-out-5' を使用。

③ LDLRの PCR

※ DMSO を加えてみたい。

Ex tag と Pfu で。

	56°C	58°C	60°C
Ex tag			
Pfu			

α 計 670bp くらいある。
プライマーは 23L のものにしよう。

※ 日照りや早くお掃除にしようと思ってる。

もし金曜早く帰る、最後まで +3 日 翌日の人に投げて OK だよ。

ただ今度放電はまか、で 30 秒は 5 分電気で止めて下へ。

④ 待つ時間がある。

LDLR のシーケンス (シーケンス)、もしくは他の配列が読めたらいい。

⑤ Daichi と L-1 のプライマーの注文。

8/30

① LDLR, CI, lacI のシーケンス準備

山崎 10:00-
山本 12:00-
上村 13:00-

5x B.D. 3.1 buffer

B.D. 3.1

MilliQ

1.8 μl x 11 = 19.8 μl

0.4 μl x 11 = 4.4 μl

6.3 μl x 11 = 69.3 μl

5'-primer

3'-primer

LDLR 090827 56°C

58°C

60°C

F-S-Gp-LDLR-out-5' F-P-Gp-LDLR-out-3'

lacI

CI

F-E-7M-lacI+tag-5'

F-E-7M-tag+lacI-3'

F-E-7M-CI+CI-5'

F-E-7M-lacI-CI+CI-3'

tube 番号

LDLR 56°C 5'

3'

58°C 5'

3'

60°C 5'

3'

lacI

5'

3'

CI

5'

3'

② Pl 23L のシーケンス

23L, N でした。

③ LDLR の PCR

電泳泳槽の手前までやりました。

8/31 にやる。

① LDLR, CI, lacI のシーケンス ← LDLR の配列、他の配列

② LDLR Ex tag 56°C 58°C 60°C
Pfu 60°C → 40 を電泳泳槽 → 1/10

③ 5' のシーケンス準備

LDLR の箱
22°C, 40 分程度

③

8/31
 孫 10:45~
 孫 14:20~

① LDLR. cI. lacI のシーケンスを読む。

② LDLR の電気泳動。

ウェル	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Ladder	LDLR	LDLR	LDLR	LDLR	LDLR	LDLR	LDLR	LDLR	LDLR	LDLR	LDLR
		ex-taq	ex-taq	ex-taq	ex-taq	ex-taq	ex-taq	ex-taq	ex-taq	ex-taq	ex-taq	ex-taq
		56°C	58°C	58°C	58°C	60°C	60°C	60°C	60°C	60°C	60°C	60°C

100V, 25min 泳動。

① LDLR. cI. lacI のシーケンス結果。

1.	LDLR	56°C	+
2.	LDLR	56°C	+
3.	LDLR	58°C	+
4.	LDLR	58°C	+
5.	LDLR	60°C	+
6.	LDLR	60°C	+
7.	lacI		+
8.	lacI		+
9.	cI		+
10.	cI		+

全部 N でいた。

サンプルは捨てたので、

LDLRの箱に-を入れてしまった。

(私のやり方がまちがっているかも)

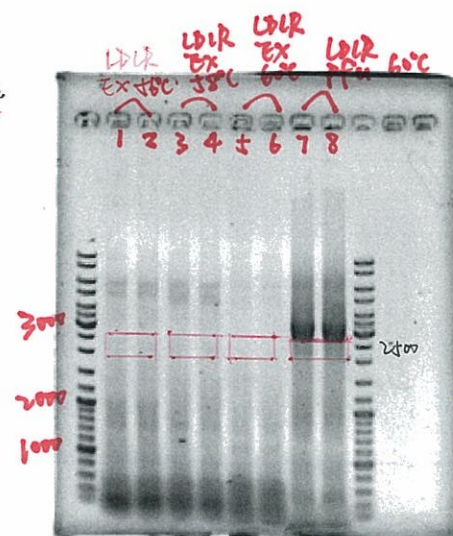
② LDLR の電気泳動。と切り出し。

Aug Mon 31 13:01:42 2009 LAS-4000#7662211 FUJINON VRF43LMD Cooling:-25 C
 Full Precision High Resolution 20sec EtBr Fluoro B Tray Position 3
 Range:1536-5631 Gradation:2560-4415 Linear LAS-4000IR ver2.0W

この写真では 200bp 付近では
 バンドが非常にうすい。

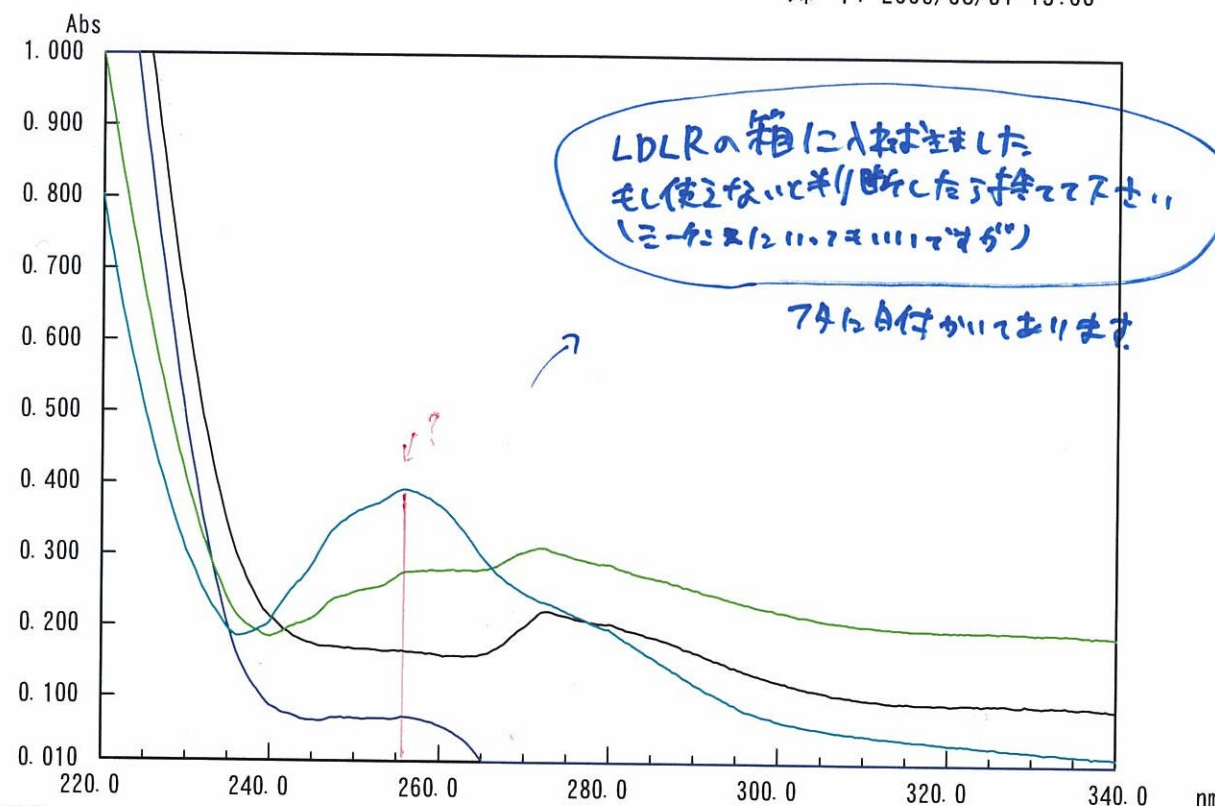
- 200bp 付近の部分を切り取った。

→ ゲルは机に放置している。



切り出したゲルをとかいて、吸光度測定をする。

レポート: 2009/08/31 15:06



計算結果

Ch	230.0 (nm)	260.0 (nm)	280.0 (nm)	320.0 (nm)	330.0 (nm)	Ratio	Conc	Pure	P. Conc	M. Conc (uM)	サンプル名 コメント
1	0.631	0.159	0.205	0.094		0.586	3.25 ug/mL	32.5	0.123 mg/mL	0.148	LDLR EXtaq 58 光路長 (mm)=2.0/希釈率=1
2	0.485	0.061	-0.069	-0.115		3.826	8.80 ug/mL	212.6	-0.062 mg/mL	0.402	LDLR EXtaq 56 光路長 (mm)=2.0/希釈率=1
3	0.407	0.278	0.288	0.197		0.890	4.05 ug/mL	49.5	0.079 mg/mL	0.185	LDLR EXtaq 60 光路長 (mm)=2.0/希釈率=1
4	0.306	0.369	0.197	0.038		2.082	16.55 ug/mL	115.7	-0.005 mg/mL	0.756	LDLR PFU 60 光路長 (mm)=2.0/希釈率=1

LDLRは増えている? orz

LDLR 8/31にやり直した ② まてないたが、このままでは③ (ミナミミグの準備) まで
 進めようになりそう。 (orz)

時言十

8/29に小松さんが PCR の lacI と、p145 の cI を PCR した
 が、8/28 の ミナミミグの結果を見ると、? な感じである。

→ 今日中に X-リスで先に進んで、いいか聞いてみます。 (or かり直し)

To do ①
 ② cI と cII を増やす (お次へへ、p145 を使うか不明)
 λ phage から cI, cII, cIII

③ lacI PCR
 ④ araC を PCR

p1 の cI と cII は cI の 1/3 もまが通るという。

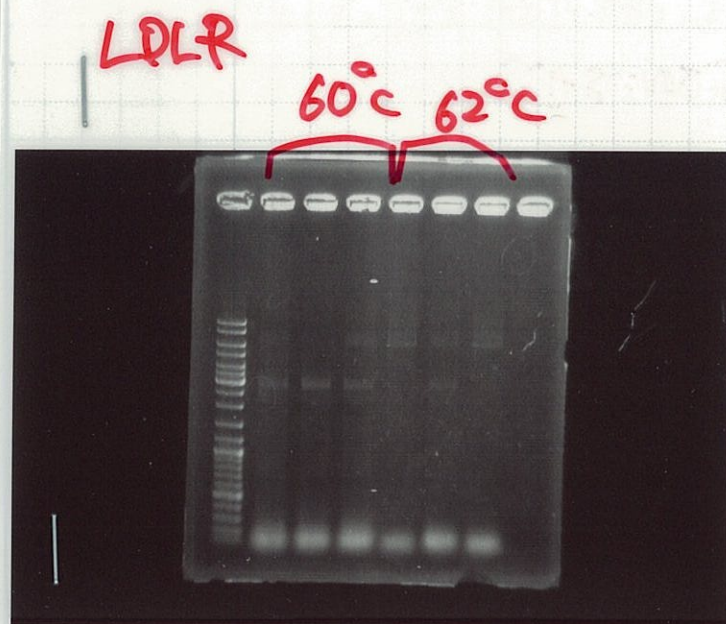
cI, cII と araC
 cI, cII と araC

シフト入る

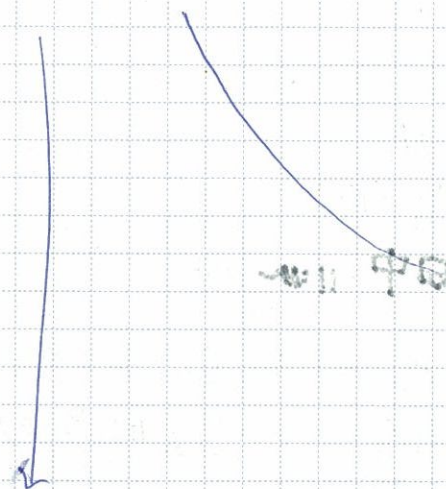
富沢さんに
 5C
 λ phage
 の作り

- ② 前々 cI, lacI のシーケンス結果
全てが N でした。

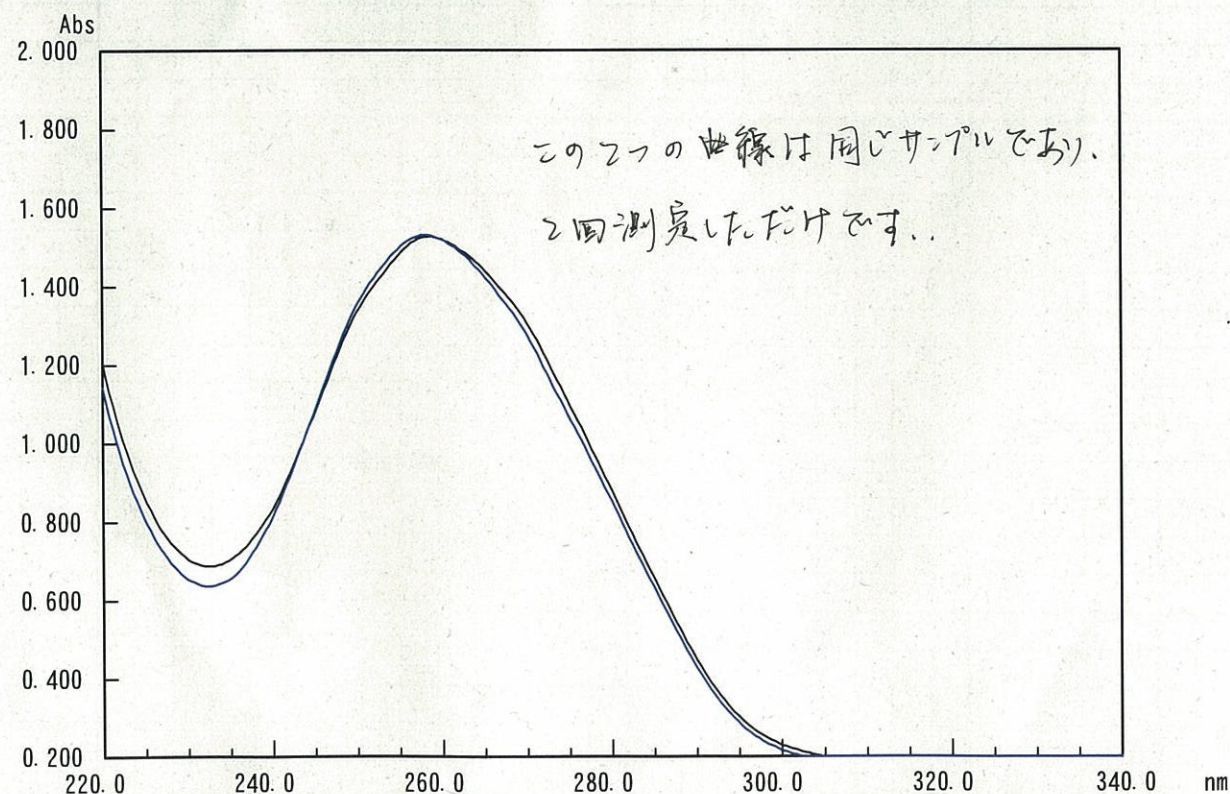
- ① LDLR の PCR 産物の電気泳動と吸光度測定。



PCR産物は取り出していた。
PCR後(精製して?) その時吸光度を測いた



レポート: 2009/09/02 16:48



計算結果

Ch	230.0 (nm)	260.0 (nm)	280.0 (nm)	320.0 (nm)	330.0 (nm)	Ratio	Conc	Pure	P. Conc	M. Conc (uM)	サンプル名 コメント
1	0.706	1.520	0.882	0.166		1.891	67.70 ug/mL	105.1	0.081 mg/mL	3.091	光路長 (mm)=2.0/希釈率=1
2	0.655	1.519	0.855	0.158		1.953	68.05 ug/mL	108.5	0.046 mg/mL	3.107	光路長 (mm)=2.0/希釈率=1

記入者

確認者

日付 年 月 日

- ② 左の LDLR の PCR 産物を P17D に infusion して。
プレートにまいた。(19:30)

- ③ 時計用のアライナーが入った箱を作りました。

9/3 にするこ。

lacI を E と S で切、P123L に入れる。

1/2 ②でまいたプレートと回収して。コロP → シーケンス...か??

9/3

上村 10:30-

~~10:30-11:00~~

やうこ

- ① 9/2 ②のプレートに生えてきたが、たがで再infusion

取り出していたので

LDLR infusion 用 9/2
P17D 090907 153.5 μ g/ml
LDLRが入っているかはわからない

を待った

今日測定

infusion後の残りは

(LDLR P17D infusion 090903) と書いてある

- ② lacI と P123L を E と S で切った

ligation のやり方がわからなかったため、切った後保存 コマナサ

42-70 の横に { lacI / ES 090903
P123L / ES 090903

書いて時計の箱へ

- ③ 8/28 ②の解析 (印刷)

ライミントは印刷して他のと一緒に水色クリップでとめた

lacI も cI も大体一致している。ほい

...いや、は完全に一致しているわけじゃないのでこれを待たるのは不安!

...みなさんどう思われます??

200 μ l tube を冷凍庫で保存するときは
1.5 ml tube に入れて中身を書いて
保存しよう!!

ケースの奥に入ると取れなくなる
& 中身がわからなくなる

如何なるときも酵素は最後に加える。
例: バッファー → 酵素 → MilliQ で mess up して
書かれています。

↑
buffer濃度が適切でないで酵素が失われます

9/4 にやるほいこ

プレート生えてきた check → 10:17:30

lacI と P123L を ligation

記入者

確認者

日付 年 月 日

9/4

鈴木 10:20~

上村 11:00~

ジョー

やったこと.

① 9/3にまいえプレートの子エーク

※生えていまして! おめでたう!

② 16:45 ② PI 23Lを Eと Xで処理。

ジョ

左木 PI 23Lは、090814使用。②, 186.00mg/ml を3ml 使用。

③ 9/3に まいえプレートの コロニー用いこコロニー PCR。

きちんと infusion が出来たかの確認のため。

※ Pfu を使用。→ 8/31 200mg/ml Pfu のアッセイによる判断(右左)。

1ml 10x standard buffer → 1ml Pfu の buffer.
0.05ml Ex-Taq → 0.05ml Pfu※ Pfu は 1kb に 15sec (100sec) とおけるが、
Ex-Taq は 1kb に 1min PCR 2は今日のコロニー PCR では Pfu は 1kb あたり 1min (合計 3kb → 3min)
としてみたが、長い分には問題はないはず。

④ Ligation

量は基本

50μl くらい

1:24 < 1:2に

なるように入る

	1	2
lacI: Ecs	4.6ml	2.3ml
PI 23L (double terminator)	0.4ml	0.4ml
MilliQ	0ml	2.3ml
Ligation Mix	5ml	5ml
	10ml	10ml

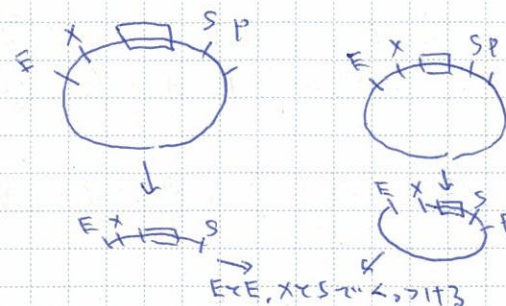
37°C で 10 min → lacI / PI 23L ② と保存

⑤ SOB, YPD 培地作成

オートクレーブまでやった

⑥ ④の1,2をトラフォックス → 金中まじえて、田中さんにお預けしました
3ml ずつ

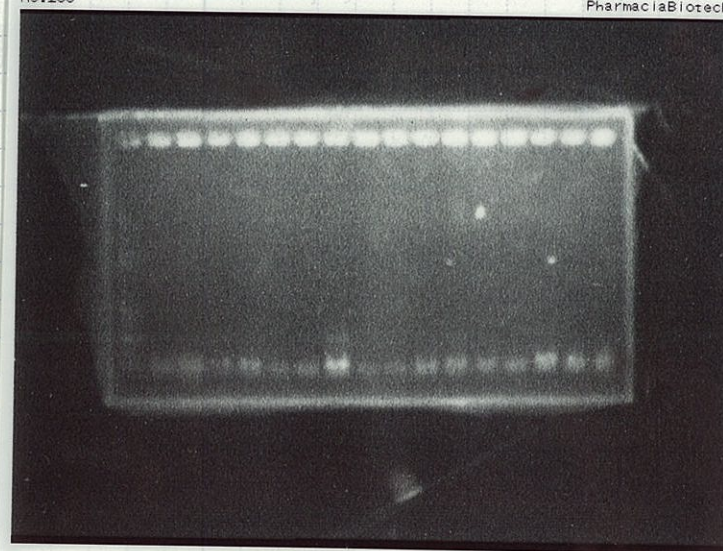
培養後が、培地にコロニーが生えなかった。

9/3②のPI 23LをEとSでかたのは間違え、
→ 9/3のPI 23LをEとSでかたのは間違え

コロニー結果

No. 286

Pharmacia Biotech



おもしろくない or PCRでいらない。

9/5

孫 10:15~

① cI ~ cII の PCR. OL ~ N の PCR.

	cI ~ cII PCR.	OL ~ N PCR.
1' primer	F-E-7M-C2+C1-3'	F-E-7M-N+OL-3'
2' primer	F-S-7M-C1-C2-3'	F-S-7M-OL+N-3'
酵素	Pfu	Pfu
size	14~6 bp	450 bp. ?
program	95°C 2min 95°C 30sec 55°C 30sec 72°C 30sec Go To 2. x 9 times 75°C forever.	95°C 2min 95°C 30sec 55°C 30sec 72°C 10sec Go To 2. x 9 times 75°C forever.

cI ~ cII は 75°C になっている。OL ~ N も、
とくに時計班の箱の中の A73-3 のゲルから、そのままゲットする。

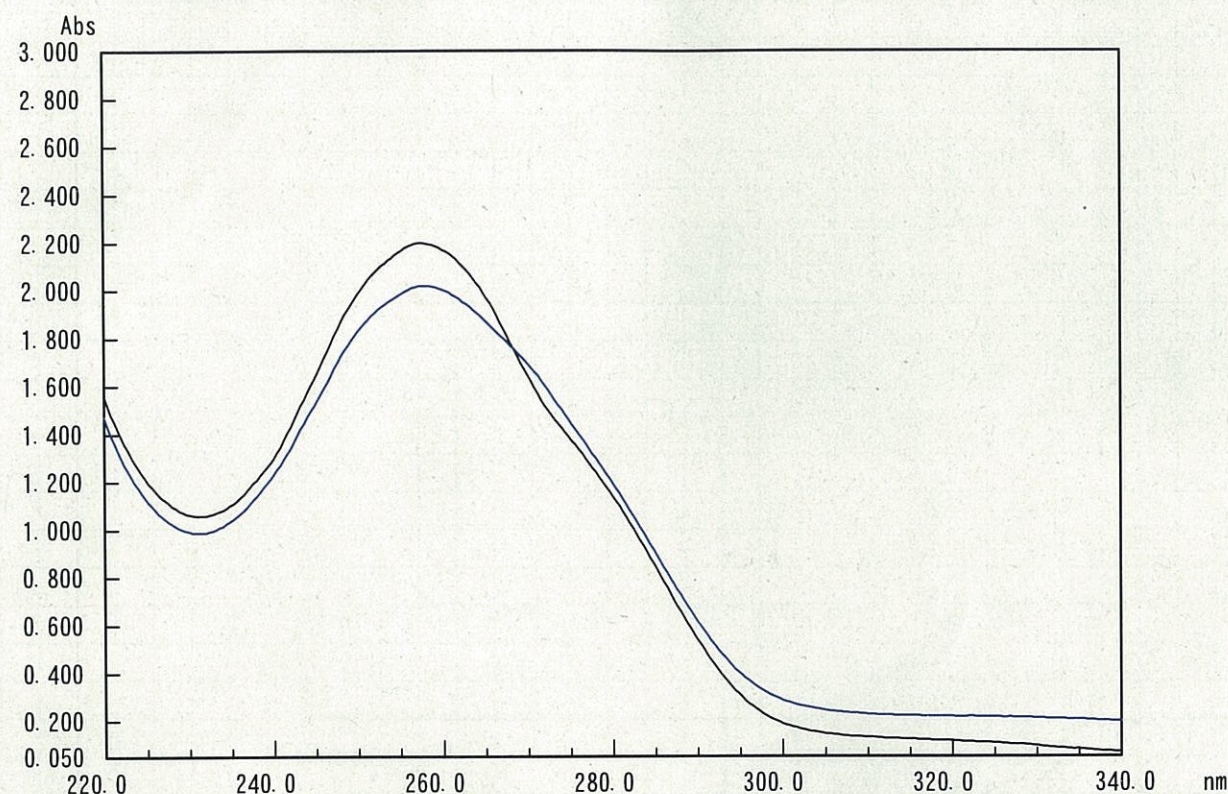
PCR産物の電気泳動結果 (20 min No. 288)

写真は見にくくてすみません。

cI ~ cII は非常に正しく 1500 くらい
だと思ふ。OL ~ N は 450 より少しづつ大きく
見えるが。N 自身は 450 bp (一番前の時計
班のそれからより)。OL の部分
は同じ程度?

カラム精製をして、吸光度測定。

日時: 2009/09/05 15:52



計算結果

Ch	230.0 (nm)	260.0 (nm)	280.0 (nm)	320.0 (nm)	330.0 (nm)	Ratio	Conc	Pure	P. Conc	M. Conc (uM)	サンプル名 コメント
1	1.063	2.170	1.141	0.115		2.003	102.75 ug/mL	111.3	0.028 mg/mL	4.692	cl cll fo infusion 光路長 (mm)=2.0/希釈率=1
2	0.993	2.004	1.195	0.218		1.828	89.30 ug/mL	101.6	0.157 mg/mL	4.078	OL N for infusion 光路長 (mm)=2.0/希釈率=1

- 今日中、合成DNA $\text{lacI-Arac-promoter}$ が届いた。
濃度 100 ng/mL 。*机の上の 2°C に保存している。plasmid pUC19。

- プライマー-
抗生物質 Amp.

F-N-GFP+tag-3'

F-N-Arac+tag-3'

が届いた。机の上のオレンジ色の箱にある。
まだ干燥状態です。

量が少ないので、大事に〜

- 注意、制限酵素処理のプライマー 済みあります。

9/6

孫 10:20 ~

a. P1 7L (RBS+ lacI) を E-S に切断

b. P1 23L (double term.) を E-X に切断。

a. P1 7L (RBS+ lacI)

3 mL

$\left\{ \begin{array}{l} 090827 \quad \text{F-E-7M-lacI+tag 5'} \\ \quad \quad \quad \text{F-S-7M-tag+lacI 3'} \\ \text{で PCR 完了} \\ \text{濃度 } 210 \text{ ng/mL} \end{array} \right\}$

10x H buffer
EcoRI / SpeI.
MilliQ

1 mL
1.5 mL / 1.5 mL
23 mL

37°C 1 hour.

30 mL の系

b. P1 23L (double term.)

2 mL

$\left\{ \begin{array}{l} 090814 \quad \text{Mini prep. 完了} \\ \text{濃度 } 155 \text{ ng/mL} \end{array} \right\}$

10x M buffer
EcoRI / XbaI
MilliQ

1 mL
1.5 mL / 1.5 mL
23 mL

37°C 1 hour

30 mL の系

(2) 上の P1 7L (RBS+ lacI) E-S 処理

P1 23L (double term.) E-X 処理。

を ligation する。

プライマーは 9/4 参照。

	1	2
lacI (E-S)	4.6 mL	2.3 mL
P1 23L (E-X)	0.4 mL	0.4 mL
MilliQ	0 mL	2.3 mL
Takara Ligation Mix (Kit Code 6023)	5 mL	5 mL
	10 mL	10 mL

- Takara manual より。

"プラスミドベクターへの外来DNA挿入。標準プライマー" 16°C 30 min.

③ DH5α コンピグセルの回収・分注。

9/17
孫 10:00 ~

① 昨日の Ligation 産物を トランスフォーメーション

1と2の二つある、それぞれ 5μL 取って

↓

コンピグセルに入れ、30 min on ice.

↓

42°C 45 sec. 終了 on ice.

↓

イッペンに LB 500 μL

↓

37°C 30 min.

↓

プレートにまく。(12~40 から.)

② 長時間放置の P17M [090806, 60 μg/mL] を Miniprep.

P14E [090802 67 μg/mL] 抗生 Amp

量不足の 基底 DNA. プラズミド pUC57 (ハダマ 2710 bp)

[lacI-araC-promoter] 抗生 Amp

流れ	P17M	P14E	pUC57.
コピに 入れる	1 μL	1 μL	0.5 μL
↓			
30 min on ice			
↓			
42°C 45 sec.			
↓			
LB 500 μL			
↓			
37°C 30 min.			
↓			
プレート	Kan	Amp	Amp

*12~40 から培養.

③ 一応 古い P17M [090806, 60 μg/mL] を E.S で切断.

P17M 3 μL
10xH buffer 1 μL
EcoRI 1.5 μL
SpeI 1.5 μL
MiniQ 2.3 μL
37°C 1 hour.

使えるかどうかは

② の Miniprep の結果による!

④ cI~cII を E.S 切断して P17M へ in fusion. X 失敗.

[cI~cII in fusion 用]
102.75 μg/mL 9月5日

2と4は 6 μg/mL. E.S 処理で 5 μL に 10 倍希釈

cI~cII 0.5 μL
切断 P17M 3 μL
10x in-fusion Reaction Buffer 1 μL
in-fusion enzyme 0.5 μL
MiniQ 0 μL

↓

37°C 15 min.

50°C 15 min.

↓

TE buffer up to 25 μL

↓

そのうち 5 μL を トライ

↓

DH5α に入れ. on ice 15 min.

↓

42°C 45 sec

LB 500 μL. プレート

⑤ OL~N を E.S 切断して P17M へ in fusion. X 失敗.

[OL~N in fusion 用]
89 μg/mL 9月5日

OL~N 0.5 μL
切断 P17M 3 μL
10x in-fusion Reaction Buffer 1 μL
in-fusion Enzyme 0.5 μL
MiniQ 0

↓

37°C 15 min

50°C 15 min

↓

TE buffer up to 25 μL.

↓

そのうち 5 μL トライ

↓

DH5α に入れ. on ice 15 min.

↓

42°C 45 sec

↓

LB 500 μL. プレート

注意. ② の結果から. 090806 作製の P17M は長時間室温の中で放置されて
いたので. 使えなくなった.

また IGEM のパーツから増すか?

制限酵素処理した後、カラム精製をかけること.

9/8.

孫 10:00 ~

田中 1:00 ~

transformation 失敗したので、9月6日の分やり直す。

① PI 23L, PI 7L
 [090814] [090827]
 155 µg/mL 210 µg/mL
 E.X 処理 E.S 処理

~~PI 7M~~
~~[090806]~~
~~60 µg/mL~~
~~E.S 処理~~

処理時間を長く取りました。

② Kan 抗生の培地が T5C15-12 ので、plate 用培地を作る。
 LB 培地 plate 用 (200 mL, plate 10 枚)

Trypton 1.0% 2g
 Yeast Extract 0.5% 1g
 NaCl 2g
 MillieQ 200 mL
 寒天 2% 4g

攪拌子を入れ、ふたを3/4で締め、オートクレーブ

③ ①の処理産物を カラム精製。

PI 7L (E.S 処理) と PI 23L (E.X 処理)。
 を Ligation する。

	1	2
PI 7L (E.S)	4.6 mL	2.3 mL
PI 23L (E.X)	0.4 mL	0.4 mL
MillieQ	0	2.3 mL
Takara Ligation Mix (Kit code 6023)	5 mL	5 mL

④ ③の産物 10 mL 中の 5 mL を トランスフォーメーション。

コンピテータセルに入れて on ice 30 min.

↓
42°C 45 sec (締めたら on ice)↓
LB 500 mL↓
37°C 30 min↓
プレートにまく。(抗生 Kan)

⑤ 昨日の PI 4E, pDC57 のコロニーを取って、培養した。(抗生 Amp)
 (明日田中と Miniprep お願い)

⑥ PI 7M を IGEM のパーツから取って、新に transformation をした。

(明日プレートのコピイお願い)

3 mL IGEM parts PI 7M

↓
コンピテータセルへ。30 min on ice.↓
42°C 45 sec.↓
トヤポンに LB 500 mL↓
37°C 30 min↓
plate にまく。(抗生 Kan)

⑦ コンピテータセルの量が異常(多い?)なので、
 control 用の plasmid を transformation に試した。

5 mL control 用 (1 pg/mL 濃度)

↓
コンピ 30 min on ice↓
42°C 45 sec.↓
LB 500 mL↓
37°C 30 min↓
plate にまく。(抗生 Amp)

明日この plate の状態を確認して、コンピテータセルへ入れる量を調整するかも。